

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. Januar 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/002760 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02433
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
27. Juni 2002 (27.06.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 32 212.7 27. Juni 2001 (27.06.2001) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): DISTLER, Jürgen [DE/DE]; Hewaldstrasse 2, 10825 Berlin (DE). LEU, Erik [DE/DE]; Mühsamstrasse 24, 10249 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5, 10178 Berlin (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATION BY COMPARATIVELY ANALYSING SINGLE STRANDS OF AMPLIFICATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNG DURCH VERGLEICHENDE ANALYSE DER EINZELSTRÄNGE VON AMPLIFIKATEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting cytosine methylation in DNA samples. A genomic DNA sample is chemically treated, preferably with a bisulfite (= disulfite, hydrogen sulfite), enabling the cytosine to be converted into uracil, while the 5-methylcytosine remains unchanged. Sections of the DNA samples are amplified with at least 2 primers in a polymerase reaction, preferably a polymerase chain reaction. Finally, the fragments are studied with respect to the base composition of both complementary strands of the amplicates, whereby the methylation status in the amplified section of the genomic DNA sample is deduced from the difference in the molecular weight of both strands.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben. Eine genomische DNA Probe wird chemisch, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Abschnitte der Proben-DNA werden mit mindestens 2 Primern in einer Polymerasereaktion, bevorzugt einer Polymerasekettenreaktion, amplifiziert. Zuletzt werden die Fragmente hinsichtlich der Basenzusammensetzung jeweils der beiden komplementären Stränge des Amplifikates untersucht, wobei aus dem Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge auf den Methylierungsstatus in dem amplifizierten Abschnitt der genomischen DNA-Probe geschlossen wird.

WO 03/002760 A2

**Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung durch  
vergleichende Analyse der Einzelstränge von Amplifikaten**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum  
Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre  
in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebe-  
10 nen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in  
RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe  
der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschal-  
tet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Ge-  
ne in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist  
15 mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw.  
des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene  
Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzel-  
ner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte  
Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt bei-  
spielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkripti-  
on, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.  
Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil  
25 genetischer Information ist daher von erheblichem Inte-  
resse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht  
durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methyl-  
cytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie  
Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation  
30 die epigenetische Information, welche die 5-Methylcyto-  
sine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten an-  
gewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methyl-  
35 cytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit  
mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydroly-

se in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt,

5 dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung

10 nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch

15 die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällung- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6).

20 Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch

25 dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

30 Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May

35 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen  
(z. B. Zeschnick M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Hor-  
sthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of  
5 Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic me-  
thylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Ge-  
net. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung ange-  
wendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines  
bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifi-  
10 ziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter  
J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation  
imprint. Nat Genet. 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne  
Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“  
(Gonzalzo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation  
15 differences at specific sites using methylation-sensitive  
single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic  
Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2529-31, WO-Patent  
9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW.  
COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation as-  
20 say. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nach-  
gewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisie-  
rung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Ein Problem der Bisulfitreaktion ist es, dass sie häufig  
25 nicht vollständig abläuft. Das heißt, dass nicht umgewan-  
delte Cytosine nicht nur auf deren Methylierung hindeuten  
können, sondern auch auf eine unvollständig abgelaufene  
Bisulfitreaktion. Daher ist es von grossen Interesse, die  
Bisulfitreaktion quantitativ verfolgen zu können und ih-  
30 ren Erfolg vor der Ermittlung des methylierungsgrades  
bestimmen zu können. Ansätze hierzu mittels Bisulfit-  
sequenzierung sind publiziert (Grunau, C., Rosenthal, A.  
Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of  
critical experimental parameters. Nucleic Acids Res. 2001  
35 Jul. 1;29(13):E65-5). Diese Methode ist jedoch langwierig  
und aufwendig und werden sehr große Probenmengen benö-

tigt, so dass sie sich für Routineanwendung weniger eignet.

5 Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-  
Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in  
genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA.  
Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids  
Res. 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

10

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in  
15 genomic DNA. Bioassays. 1994 Jun.;16(6):431-6, 431;  
Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke  
B, Dörfler W. Imprinted segments in the human genome:  
different DNA methylation patterns in the Prader-  
Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997  
20 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J,  
Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes:  
improved protocol for bisulphate genomic sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Feb. 25;22(4):695-6; Martin V,  
25 Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May  
19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

30

Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 3;93(18):9821-6).  
35 Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entwe-

der nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position un-  
methylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer,  
welche nur an eine Nukleinsäure bindet, die durch die Bi-  
sulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position un-  
methylierten DNA entsteht. Mit diesen Primer können dem-  
nach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum  
Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder un-  
methylierten Position in der Probe liefern, an welche die  
Primer binden.

Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-  
Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-  
Light bekannt geworden ist (WO00/70090). Mit diesem Ver-  
fahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner  
oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nach-  
zuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Pro-  
dukte erübrigt.

Stand der Technik ist wiederum ein von Epigenomics entwi-  
ckeltes Verfahren, welches zu untersuchende DNA und Hin-  
tergrund-DNA nach Bisulfit-Behandlung gleichermaßen  
amplifiziert und dann die im Fragment enthaltenen ehema-  
ligen CpG Positionen durch Hybridisierungstechniken un-  
tersucht, alternativ mittels MiniSequenzierung oder ande-  
ren gängigen Verfahren. Dies hat den Vorteil, dass man  
ein quantitatives Bild bezüglich der untersuchten Methy-  
lierungspositionen erhält, d. h. es erfolgt die Bestim-  
mung des Methylierungsgrades einer Vielzahl von Positio-  
nen, was z. B. bei soliden Tumoren eine sehr genau Klas-  
sifizierung ermöglicht.

Für die Markierung von Amplifikaten sind vielfach fluo-  
resziert markierte Primeroligonukleotide verwendet wor-  
den. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist  
das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-

Ende des jeweiligen Primers. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

- Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-
- 5 Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karras M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct. 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird
- 10 in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich
- 15 stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.
- 20 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren
- 25 ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch
- 30 die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es
- 35 zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht ver-

ringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Nach der Erfindung der PCR sind in den folgenden Jahren zahlreiche Varianten bekannt geworden, die diese Technik zur Amplifikation der DNA verfeinern. Insbesondere ist hier die Multiplexierung der PCR (Multiplex-PCR) zu erwähnen, wobei man mehr als 2 spezifische Primer einsetzt und dabei in einem Reaktionsgefäß eine Vielzahl von verschiedenen, spezifische n Amplifikation erzeugen kann. Besonders interessant ist auch die sogenannte Nested PCR, welche unter anderem zum Nachweis besonders geringer DNA Mengen verwendet wird. Diese Art der PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen, wobei die Primer der zweiten Amplifikation innerhalb des ersten Amplifikates liegen und nicht mit den Primern der ersten Amplifi-



kation identisch sind. Dadurch wird eine besondere Spezifität erreicht, da die Primer der zweiten Amplifikation nur dann funktionieren, wenn in der ersten Amplifikation das beabsichtigte Fragment erzeugt wurde. Dagegen ist die  
5 die Vermehrung etwaiger Nebenprodukte der ersten Amplifikation in der zweiten so gut wie ausgeschlossen.

Es sind demnach bislang vielerlei Verfahren zur Methylierungsanalyse Stand der Technik. Die meisten dieser Ver-  
10 fahren erlauben die Analyse von einzelnen Positionen im Genom, einige, wie zum Beispiel Hybridisierungstechniken an Oligomer Arrays, erlauben die Analyse einer Vielzahl von Positionen gleichzeitig. Der experimentelle Aufwand dieser Verfahren ist jedoch vergleichsweise hoch. Die  
15 vorliegende Erfindung soll ein Verfahren bereitstellen, das es nach den Bisulfit Behandlung und Amplifikation mit in molekularbiologischen Laboratorien verbreiteter Instrumentierung wie Kapillargelelektrophorese oder HPLC erlaubt, eine direkte Methylierungsanalyse in dem gesamten  
20 Fragment ohne weitere Schritte durchzuführen. Die Methode verzichtet dabei auf die Analyse bestimmter Einzelpositionen, sondern analysiert das Ausmaß der Methylierung in dem untersuchten Fragment.

25 Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass sich die Basenzusammensetzung der DNA in der Bisulfit-Behandlung und in der nachfolgenden Amplifikation auf charakteristische Weise ändert und dass sich allein daraus ein Analyseverfahren zum Nachweis von Cytosin-  
30 Methylierung ableiten lässt. Wird eine genomische DNA Probe mit Bisulfit behandelt, so werden alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil umgewandelt und in der nachfolgenden Amplifikation in Thymin. Demzufolge nimmt die Anzahl der Cytosinbasen grundsätzlich ab, und zwar  
35 umso mehr, je geringer der Methylierungsgrad des betreffenden amplifizierten Abschnittes der DNA-Probe ist. Ent-

sprechend nimmt die Anzahl der Thyminbasen zu, je geringer der Methylierungsgrad ist. In dem in der Amplifikation gebildeten komplementären Gegenstrang ist es umgekehrt so, dass je geringer der Methylierungsgrad in der DNA Probe war, umso mehr Adenin eingebaut wurde. Umgekehrt enthält der Gegenstrang umso mehr Guanin, je höher der Methylierungsgrad der DNA-Probe war.

Dies führt nun zu dem Effekt, dass sich die Molmasse der beiden in der Amplifikation gebildeten komplementären Stränge umso mehr unterscheidet, je geringer der Methylierungsgrad in dem amplifizierten Abschnitt der genomischen DNA-Probe ist. Eine Umwandlung des Cytosins in dem einen Strang in letztlich Thymidin führt zu einer Erhöhung der Masse um jeweils 15 Da, während auf dem komplementären Strang sich dadurch, dass entsprechend Guanin durch Adenin ersetzt wird, eine Verringerung der Molekülmasse um 16 Da ergibt. Daraus folgt, dass sich aus der Umwandlung jedes zusätzlichen Cytosins in letztlich Thymin eine zusätzliche Massendifferenz von 31 Da zwischen den beiden komplementären Strängen des Amplifikates ergibt.

Die vorliegende Erfindung nutzt nun mehrere Verfahren, um diese Massendifferenz aufzuzeigen und daraus unmittelbar Information über den Methylierungszustand des untersuchten Abschnittes der genomischen DNA Probe abzuleiten.

Zusätzlich zu der sich mit abnehmender Methylierung verändernden Molekülmasse der Einzelstränge gibt es noch weitere Effekte, die hier ausgenutzt werden können. Jede Umwandlung von Cytosinbasen in Thymidin führt beispielsweise zu dem Verlust einer Aminofunktion in dem jeweiligen Einzelstrang, während in dem anderen Strang Guanin gegen Adenin auszutauschen ist und dabei jedoch die Aminofunktion erhalten bleibt. Auch dadurch verändern sich je nach gewähltem Analyseverfahren die Eigenschaften

der jeweiligen Einzelstränge zueinander erheblich. In jedem Fall lässt sich aber eine unmittelbare Abhängigkeit dieser Eigenschaften vom Methylierungsgrad herstellen.

- 5 Zur Analyse der Einzelstränge lassen sich mehrere Verfahren nutzen, die hier beschrieben werden sollen. Insbesondere ist denaturierende Gelelektrophorese, bevorzugt die Kapillargelelektrophorese, zur Auftrennung der Einzelstränge geeignet (siehe Beispiel 1). Normalerweise wird  
10 in der Gelelektrophorese, wenn sie nicht denaturierend durchgeführt wird, die DNA im wesentlichen in Abhängigkeit von ihrer Länge aufgetrennt. Dabei dienen DNA Fragmente bekannte Länge als Standard. Bei denaturierender  
15 Gelelektrophorese hingegen erfolgt oft auch eine Auftrennung in Abhängigkeit von der Sequenz, wenn diese unterschiedliche Konformationen und Sekundärstrukturen des DNA-Einzelstranges bedingen. Eine der bekanntesten Techniken in diesem Zusammenhang ist die SSCP.
- 20 Da jedoch hier ein Methylierungsgrad innerhalb eines Fragmentes festzustellen ist, dem eine Vielzahl möglicher unterschiedlicher Sequenzen nach der Bisulfit-Behandlung gegenüberstehen, eignen sich derartige Methoden nicht so gut, da man sehr viele verschiedene Fälle unterscheiden  
25 muss. Jedoch ist eine Anwendung der SSCP auch für Methylierungsanalyse in diesem Sinne denkbar.

Der besondere Vorteil dieser Erfindung im Hinblick auf die Gelelektrophorese ist jedoch, dass sich die Basenzusammensetzung in der Bisulfit-behandelten und amplifizierten DNA wesentlich von der genomischen unterscheidet,  
30 und zwar umso mehr, je geringer ihr Methylierungsgrad ist. Diese Unterschiede sind extrem genug, dass man sie, wie in Beispiel 1 gezeigt, auch unmittelbar zur Methylierungsanalyse verwenden kann, da sich das Verhalten in der  
35 Kapillargelelektrophorese messbar in Abhängigkeit von der

Sequenz ändert. Besonders sinnvoll und bevorzugt ist es auch, den Abstand der Banden für die beiden jeweiligen Einzelstränge des PCR-Produktes als Mass für den Methylierungsgrad in der genomischen Probe zu verwenden.

5

Ähnliches gilt auch für die zwei Peaks einer denaturierenden HPLC, die analog ausgewertet werden kann. Auf geeigneten Reversed-Phase Säulen, bevorzugt in Verbindung mit Triethylammoniumacetat/Acetonitril Gradienten eluiert, lassen sich die beiden Einzelstränge ebenfalls auf-

10 trennen. Auch hier ist die Retentionszeit wiederum unmittelbar abhängig von der Basenzusammensetzung und damit letztlich von dem Methylierungsgrad der genomischen DNA-Probe in dem betreffenden Fragment.

15

Es ist auch möglich und bevorzugt, die HPLC bei einer Temperatur durchzuführen, in der die DNA zumindest partiell noch doppelsträngig vorliegt. Die dabei gebildeten Duplexes und Heteroduplexes können ebenfalls in Abhängigkeit von der Anzahl der Fehlpaarungen von der HPLC aufgetrennt werden. Dies erlaubt es, ein Bild von der Homogenität der Methylierung zwischen zwei Proben zu erzeugen.

20 Es ist auch möglich und bevorzugt, Methylierung auf diese Art unmittelbar zu messen, wenn ein bekanntes Referenzamplifikat zugesetzt wird, das aus einer im Methylierungsmuster gut charakterisierten und mit Bisulfit behandelten Probe gewonnen wurde. Die Peaks erlauben in diesem Falle einen Rückschluss auf die Ähnlichkeit des Methylierungsmusters mit dem der Referenz-DNA.

25

30

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird dadurch gelöst, dass ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben geschaffen wird bei dem man die folgenden Schritte ausführt:

35

- a) eine genomische DNA Probe wird chemisch, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), derart behandelt, dass Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
- 5 b) Abschnitte der Proben-DNA werden mit mindestens 2 Primern in einer Polymerasereaktion, bevorzugt einer Polymerasekettenreaktion, amplifiziert und
- 10 c) die Fragmente werden hinsichtlich der Basenzusammensetzung jeweils der beiden komplementären Stränge des Amplifikates untersucht, wobei aus dem Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge auf den Methylierungsstatus in dem amplifizierten Abschnitt der genomischen DNA-Probe geschlossen wird.
- 15 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden der oder die Unterschiede im Molekulargewicht der beiden Stränge durch denaturierende Gelelektrophorese gemessen. Analog dem Molekulargewicht kann die Bruttozusammensetzung der DNA in Bezug auf die Nukleobasen A, C, T und G betrachtet werden. Im folgenden wird jedoch der Einfachheit halber immer nur auf das Molekulargewicht Bezug genommen. In einer wiederum besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge durch Kapillargelelektrophorese bestimmt.
- 20
- 25
- 30 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge durch chromatographische Verfahren gemessen. Besonders bevorzugt handelt es sich bei diesem chromatographischen Verfahren um denaturierende Hochdruckflüssigkeits-chromatographie (HPLC).
- 35 Besonders bevorzugt tragen zusätzlich zum Molekulargewicht auch noch weitere Faktoren wie z. B. der unter-

schiedliche Gesamtgehalt an Guanin, an Aminofunktionen oder Ketofunktionen der beiden komplementären Stränge zu ihrem unterschiedlichen Verhalten in einer der oben erwähnten analytischen Methoden bei.

5

Ebenfalls ist es besonders bevorzugt, den Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge durch Massenspektrometrie zu bestimmen. Da ausschliesslich die Massendifferenz der beiden Stränge bestimmt wird, erübrigt sich hier eine Kalibrierung. Es ist jedoch offensichtlich, dass es ebenfalls möglich ist, die Massen der beiden Stränge getrennt zu bestimmen und nur eine Masse für die Methylierungsanalyse heranzuziehen.

10

Besonders bevorzugt ist auch eine Verfahrensvariante, bei der Referenz-DNA bekannter Zusammensetzung und gleicher oder ähnlicher Länge bei der Analyse als externer oder interner Standard verwendet wird. Wiederum besonders bevorzugt handelt es sich bei dieser Referenz-DNA um Bisulfit-behandelte DNA aus einer Referenzprobe mit bekanntem Methylierungsstatus handelt oder aber um die ohne vorherige chemische Behandlung amplifizierte genomische DNA mit gleicher oder ähnlicher Fragmentlänge wie das jeweils analysierte Fragment. Diese Verfahrensvariante wird vorzugsweise mit kleinen Probenvolumina durchgeführt und eignet sich darüber hinaus bevorzugt für den Massendurchsatz.

20

25

In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird zugleich mit der Analyse des Methylierungsstatus eine Kontrolle der Qualität und Vollständigkeit der Bisulfitreaktion durchgeführt. Die Bisulfitreaktion läuft vor allem dann nicht ab, wenn die zu behandelte DNA nicht einzelsträngig vorliegt. Bei unvollständiger Denaturierung kann eine Fraktion der DNA praktisch vollständig unumgewandelt verbleiben. Je nach Spezifität der

30

35

Primer kann es dann zur Amplifikation von umgewandelter DNA und Resten praktisch genomischer DNA kommen. Diese genomischen Amplifikate lassen sich gleichzeitig mit der Analyse des Methylierungsstatus nachweisen, da auch Frag-  
5 mente mit in etwa durchschnittlicher Basenzusammensetzung und damit etwa der erwarteten Masse beobachtet werden (Beispiel 4). Besonders bevorzugt ist es auch, Primer zu verwenden, die gleichermaßen Bisulfit-umgewandelte wie auch genomische DNA amplifizieren, um auf diese Art auch  
10 geringe Mengen nicht umgewandelter DNA nachweisen zu können.

Besonders bevorzugt ist also ein Verfahren, bei dem man zugleich die Qualität der Bisulfitreaktion und den Methylierungsgrad misst, indem auch nicht umgewandelte Fraktionen nachgewiesen werden. Dies wird bevorzugt dadurch erzielt, dass die verwendeten Primer gleichermaßen Bisulfit-umgewandelte sowie genomische DNA amplifizieren.

20 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens gewinnt man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums, aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern  
25 und allen möglichen Kombinationen hiervon.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durch. Besonders bevorzugt erfolgt die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose. Ebenfalls bevorzugt ist es, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.  
35

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die Amplifikation mehrerer Fragmente in einem Reaktionsgefäß in Form einer Multiplex-PCR durchgeführt.

5 Die in den Amplifikationen verwendeten Primer amplifizieren besonders bevorzugt keine Fragmente aus nicht mit Bisulfit behandelter genomischer DNA (oder nur in vernachlässigbarem Ausmaß), so dass sie für die mit Bisulfit umgewandelte DNA spezifisch sind. Dies schützt vor fehlerhaften Ergebnissen im Falle einer unvollständigen Umwandlungsreaktion mit beispielsweise Natriumbisulfit, erlaubt  
10 dann aber nicht den Nachweis auch der Qualität der Bisulfitreaktion.

15 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Amplifikate für die Detektion mit mindestens einer nachweisbaren Markierung versehen, die bevorzugt durch Markierung der Primer während der Amplifikation eingebracht wird. Besonders bevorzugt sind die Markierungen  
20 Fluoreszenzmarkierungen oder Radionuklide. Besonders bevorzugt werden die beiden Stränge der Amplifikate getrennt und insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen und somit durch ihre jeweilige Masse eindeutig charakterisiert.

25 Besonders bevorzugt ist auch eine Verfahrensvariante bei der man aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des  
30 Patienten schließt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines der beschriebenen Verfahrensvarianten zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für  
35 Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien ange-



hören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines der beschriebenen Verfahrensvarianten zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays entsprechend einer der beschriebenen Verfahrensvarianten.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1:

Amplifikation von Fragmenten des MdrI Gens durch PCR (genomische DNA)

Für die Experimente wurde humane DNA (Promega) verwendet. Das MdrI-Fragment wurde mit den PCR-Primern

CAAGCATGCTGAAGAAAGACCACTGCAG (SEQ-ID: 1) und  
TGGGAAGTGTCCCATAGTAGCTCCAGC (SEQ-ID: 2) unter folgenden  
Reaktionsbedingungen amplifiziert:

5     1     µl     Promega\_DNA (2ng/µl)  
      0,2   µl     Taq Polymerase (5U/µl)  
      0,2   µl     dNTP's (Endkonzentration je 200µM)  
      1     µl     dATP Fluorescein-markiert (0,5 µM Endkonzentra-  
         tion)  
10    2,5   µl     10xPCR Puffer (Qiagen)  
      2     µl     Primer (SEQ-ID 1 und 2) je 25pmol/µl  
      18,1 µl     Wasser

Die Amplifikation erfolgte in einem PCR-Thermocycler (Ep-  
15    pendorf) unter Verwendung des folgenden Programms:

	Step1	15min	95°C
	Step2	1min	95°C
	Step3	45sec	61°C
20	Step4	1min15sec	72°C
	Step5	GOTO Step 2	(39 x).
	Step6	10min	72°C
	Step7	HOLD	4°C

25    Das so hergestellte MdrI-PCR-Produkt hat eine Länge von  
      633 bp und die Sequenz:

CAAGCATGCTGAAGAAAGACCACTGCAGAAAAATTTCTCCTAGCCTTTTCAAAGGTG  
TTAGGAAGCAGAAAGGTGATACAGAATTGGAGAGGTCGGAGTTTTGTATTAAGTGT  
30    ATTAAATGCGAATCCCGAGAAAATTTCCCTTAAGTACGTCCTGTAGTTATATGGATA  
TGAAGACTTATGTGAAGTTTGAAGACGTGTCTACATAAGTTGAAATGTCCCCAATG  
ATTCAGCTGATGCGCGTTTCTCTACTTGCCCTTTCTAGAGAGGTGCAACGGAAGCCA  
GAACATTCTCCTGGAAATTCAACCTGTTTCGCAGTTTCTCGAGGAATCAGCATTCA  
GTCAATCCGGGCGGGAGCAGTCATCTGTGGTGAGGCTGATTGGCTGGGCAGGAACA  
35    GCGCCGGGGCGTGGGCTGAGCACAGCCGCTTCGCTCTCTTTGCCACAGGAAGCCTGA  
GCTCATTCGAGTAGCGGCTCTTCCAAGCTCAAAGAAGCAGAGGCGGCTGTTTCGTTTC  
CTTTAGGTCTTTCCACTAAAGTCGGAGTATCTTCTTCCAAAATTTACGTCTTGGTG  
GCCGTTCCAAGGAGCGCGAGGTAGGGGCACGCAAAGCTGGGAGCTACTATGGGACAG  
TTCCCA (SEQ-ID: 3).

## Beispiel 2:

Amplifikation von bisulfit-behandelten Fragmenten des  
MdrI Gens durch PCR zur Analyse des Methylierungsstan-  
des

Für die Herstellung von aufmethylierter humaner DNA, wel-  
che als Standard für die weiteren Untersuchungen dienen  
soll, wurden 700ng DNA mit der CpG-spezifischen Methylase  
SssI (BioLabs Inc) nach Herstellerangaben umgesetzt. Die-  
se methylierte DNA und nicht modifizierte humane DNA wur-  
de, wie beschrieben mit Bisulfit behandelt (Olek A, Os-  
wald J, Walter J. A modified and improved method for bi-  
sulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Ac-  
ids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Ebenso wurde eine  
DNA-Probe mit Bisulfit behandelt, welche entsprechend  
nicht aufmethyliert wurde. Von diesen beiden Bisulfit-  
behandelten DNA-Proben wurde mit den Primern  
TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG (SEQ-ID: 4) und  
TAAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC (SEQ-ID: 5) ein, dem genom-  
ischen Fragment entsprechendes Bisulfit-Fragment, durch  
PCR amplifiziert. Die PCR-Reaktionsbedingungen waren wie  
folgt:

25	1	µl	Bisulfit-behandelte DNA (10ng/µl)
	0,2	µl	Taq Polymerase (5U/µl)
	0,2	µl	dNTP's (Endkonzentration je 200µM)
	1	µl	dATP Fluorescein-markiert (0,5 µM Endkonzentration)
30	2,5	µl	10xPCR Puffer (Qiagen)
	2	µl	Primer je 5pmol/µl
	18,1	µl	Wasser

Die Amplifikation erfolgte in einem PCR-Thermocycler (Eppendorf) unter Verwendung des folgenden Programms:

	Step1	15min	95°C
5	Step2	1min	95°C
	Step3	45sec	55°C
	Step4	1min15sec	72°C
	Step5	GOTO Step 2	(39 x)
	Step6	10min	72°C
10	Step7	HOLD	4°C

Das so hergestellte MdrI-PCR-Produkt hat eine Länge von 633 bp und die methylierte Variante hat die folgende Sequenz:

15 TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAGAAAAATTTTTTTTAGTTTTTTTAAAGGTG  
 TTAGGAAGTAGAAAGGTGATATAGAATTGGAGAGGTCGGAGTTTTGTATTAATTGT  
 ATTAATGCGAATTCGAGAAAATTTTTTTAATTACGTTTTGTAGTTATATGGATA  
 TGAAGATTTATGTGAATTTTGAAAGACGTGTTTATATAAGTTGAAATGTTTTTAATG  
 20 ATTTAGTTGATGCGCGTTTTTTTATTGTTTTTTTTAGAGAGGTGTAACGGAAGTTA  
 GAATATTTTTTTTGGAAATTTAATTTGTTTCGTAGTTTTTCGAGGAATTAGTATTTA  
 GTTAATTCGGGTCGGGAGTAGTTATTTGTGGTGAGGTTGATTGGTTGGGTAGGAATA  
 GCGTCGGGGCGTGGGTTGAGTATAGTCGTTTCGTTTTTTTTTGTATAGGAAGTTTGA  
 GTTTATTCGAGTAGCGTTTTTTTTAAGTTTAAAGAAGTAGAGGTCGTTGTTTCGTTTT  
 25 TTTTAGGTTTTTTTATTAAAGTCGGAGTATTTTTTTTTTAAAATTTTACGTTTTGGTG  
 GTCGTTTTAAGGAGCGCGAGGTAGGGGTACGTAAAGTTGGGAGTTATTATGGGATAG  
 TTTTTA (SEQ-ID:6).

### 30 Beispiel 3: Analyse der PCR-Fragmente durch Kapillar-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte mit dem Kapillar-Elektrophoresesystem ABI Prism 310, ausgestattet mit Modul  
 35 GS STR POP4 (Applied Biosystems, Weiterstadt) unter denaturierenden Bedingungen in einer Kapillare (Länge 47cm, Durchmesser 50µm). Probenvorbereitung und Laufbedingungen waren wie vom Gerätehersteller empfohlen. Die Fragmentgrößenbestimmung erfolgte über den internen Längenstandard ROX-1000 (Applied Biosystems).  
 40

Die gewählten Laufbedingungen waren:

	Injektionszeit	2sec
	Injectionsspannung	3,5 kV
	Laufspannung	15 kV
5	Temperatur	60°C
	Laufzeit	45min.

Es wurden unter diesen Bedingungen zum einen die amplifi-  
zierte genomische DNA sowie die aufmethylierte und die  
10 nicht aufmethylierte und anschliessend Bisulfit behandel-  
ten DNA-Proben gemessen. Es war zu erwarten, dass für die  
statistisch zusammengesetzten jeweiligen Einzelstränge  
des Amplifikats der genomischen DNA ein Wert gemessen  
werden würde, der im wesentlichen der tatsächlichen Länge  
15 des Fragmentes entspricht. Dies bestätigte sich, für das  
Amplifikat wurde für die beiden Einzelstränge ein Wert  
von 630.45 Basen bzw. 632.56 Basen gemessen, der theore-  
tische Wert liegt bei 633 Basen (Figur 1c).

20 Bei den Amplifikaten der Bisulfit-DNA war nun zu erwar-  
ten, dass die Werte stärker abweichen würden, da die Ba-  
senzusammensetzung der Stränge, insbesondere die der Gua-  
nine und Cytosine, nicht mehr gleich verteilt ist. Ent-  
sprechend obigen Überlegungen war auch damit zu rechnen,  
25 dass sich bei der aufmethylierten DNA-Proben ein geringe-  
rer Unterschied zwischen beiden Strängen ergibt als bei  
der nicht aufmethylierten Probe. Die bestätigt sich durch  
das Experiment. Für die nicht aufmethylierte Probe werden  
Werte von 620.87 Basen und 640.46 Basen für die jeweili-  
30 gen Einzelstränge gefunden (Figur 1a, bei statistischer  
Verteilung der Basen wären 633 zu erwarten), bei der auf-  
methylierten DNA-Probe ergeben sich Werte von 622.56 Ba-  
sen und 640.69 Basen (Figur 1b). Der gemessene Unter-  
schied entspricht also für aufmethylierte DNA 18.13 Ba-  
35 sen, hingegen für nicht aufmethylierte DNA 19.59 Basen.  
Dieser messbare Unterschied von 1.46 kann unmittelbar für

die Diagnose des Methylierungszustandes in einer unbekannten Probe herangezogen werden.

5      Beispiel 4: Qualitätskontrolle für die Bisulfitreaktion durch Fragmentanalyse

Als Standard-Qualitätskontrolle für die Bisulfitreaktion eignet sich ein beispielsweise ein Fragment des NME3-Gens.  
10      Allerdings wird man in der Praxis immer das Gen auswählen, dessen Methylierungsstatus man jeweils untersuchen möchte. Für die Amplifikation wurden unspezifische Primer verwendet, die in der Lage sind, bisulfitbehandelte und genomische DNA zu amplifizieren. Die Amplifikation des  
15      Fragments wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. Das so hergestellte NME3 PCR-Produkt hat eine Länge von 686 bp und die Sequenz:

```
20      AAGGGAATAAAGAGAAAAGAAGTACCCAGGGTCGTGGTGTCTTTGCGCTCTGTCTTT
      AGGACCGGGGAGAGAAGGGCTGACGCTGTGGTCGTGGCCCTGGCCGGGGGGGCGCGG
      GGGGGGCGGGGTTCGGGCGGTGCGGAGCAGGGCGCCGCTGGGTGGAACCACTGGG
      CGGGTTGTGGGGGATACAGTTAGTGTCCGAGCTGCTGGAGGAGACTTGGCCTCCGCA
      GCTGCCCTCCGGCCCCCACGGCTGCCGGGTTCGGGGTGCAAGTGAAGCAGCCTCC
      CCGCGGAGGCCGAGCGCCCCGACCAGGCCTCTTTAAGCGCAGGCCCCGCCCCGGGC
25      GCCACCGCCCCGCCCCGCGGATCCCGCTCCCGCACCGCCATCATGATCTGCCTGGTG
      CTGACCATCTTCGCTAACCTCTTCCCCGCGGGTGAGCCGCGCGGCGCGGGCCGGGGG
      CGGGTGGCCGGTGCTGGGCCGGCCTGACGGCCCGTCCCCGCCTGCCCCGCAGCCTGC
      ACCGGCGCACACGAACGCACCTTCCTGGCCGTGAAGCCGGACGGCGTGACGGCGG
      CTGGTGGGCGAGATTGTGCGGCGCTTCGAGAGGAAGGGCTTCAAGTTGGTGGCGCTG
30      AAGCTGGTGCAGGTGGGGGCGCGGTGAGCGAGCGGGGCGCGGTGTGGGGGAAGGG
      GA (SEQ-ID: 7).
```

Für die Amplifikation wurden die folgenden unspezifischen Primer verwendet:

35      AAG GGA ATA AAG AGA AAA GAA GTA (SEQ-ID: 8) und TCC CCT  
TCC CCC CAC A (SEQ-ID: 9).

Die Bisulfit-Behandlung wurde wie in der Literaturstelle (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 DEC 15;24(24):5064-6) durchgeführt. Die anschließende Amplifikation wurde analog Beispiel 2 durchgeführt.

Das erhaltene bisulfitbehandelte Fragment hat die Sequenz:

```
AAGGGAATAAAGAGAAAAGAAGTATTTAGGGTCGTGGTGTTTTTGCGTTTTGTTTT
AGGATCGGGGAGAGAAGGGTTGACGTTGTGGTCGTGGTTTTGGTCGGGGGGCGCGG
GGGGGGCGGGGTTCCGGCGGTGCGGAGTAGGGCGTCGCGTGGGTGGAATTATTTGGG
CGGGTTGTGGGGGATATAGTTAGTGTTCGAGTTGTTGGAGGAGATTGTTTTTCGTA
15 GTTGTTTTTTCGGTTTTTTACGGTTGTCCGGTTTCGGGGTGTAAGTGAAGTAGTTTTT
TCGCGGAGGTTCGTAGCGTTTCGATTAGGTTTTTTTAAGCGTAGGTTTCGTTTCGGGC
GTTATCGTTTCGTTTCGCGGATTTTCGTTTTTCGTATCGTTATTATGATTTGTTTGGTG
TTGATTATTTTCGTTAATTTTTTTTTTCGCGGGTGAGTCGCGCGGCGCGGGTCGGGG
CGGGTGGTCGGTGTGGGTCCGGTTTGACGGTTCGTTTTTCGTTTGTTTCGTAGTTTGT
20 ATCGGCGTATACGAACGTATTTTTTTTGGTCGTGAAGTCGGACGGCGTGTAGCGGCGG
TTGGTGGGCGAGATTGTGCGGCGTTTCGAGAGGAAGGGTTTTAAGTTGGTGGCGTTG
AAGTTGGTGTAGGTGGGGGCGCGGTGAGCGAGCGGGGGCGCGGTGTGGGGGAAGGG
GA(SEQ-ID: 10).
```

Die Analyse der PCR-Fragmente wurde mittels Kapillargelelektrophorese analog Beispiel 3 durchgeführt. Es war zu erwarten, daß die Abweichung von der theoretischen Fragmentlänge für das Fragment des Gens NME3 deutlich größer ist, da dieses Fragment überdurchschnittlich viele Cytosine enthält. Entsprechend wurden Werte für die beiden Einzelstränge von 670 und 708 gemessen, der theoretische Wert beträgt 686. Die große Aufspaltung von 37 bp ermöglicht eine einfache Identifikation genomischer Restanteile, die über die unspezifischen Primer mitamplifiziert werden. Bei einer vollständigen Umwandlungen können zwi-

schen den bisulfitspezifischen Peaks (A und B) keine zusätzlichen genomischen Peaks (C) detektiert werden.

5 Hiermit konnte gezeigt werden, daß sich die Fragmentanalyse zudem zur Qualitätskontrolle der Bisulfitreaktion eignet.

Legende zu den Figuren:

10 Figuren 2-4: linke Spalte: Fragmentanalyse; mittlere Spalte: Gelbild; rechte Spalte: Methode

Fig. 2: Methode A: Reaktionstemperatur: 50°C; Reaktionszeit: 5h; Thermo-Spikes: keine; Aufspaltung: 37 (671 - 708); Restgenomische Anteile detektierbar(C); Keine vollständige Umwandlung  
15

Fig. 3: Reaktionstemperatur: 50°C; Reaktionszeit: 2.5h; Thermo-Spikes: 10; Splitting: 37 (671 - 708); Keine restgenomischen Anteile detektierbar; Vollständige Umwandlung  
20

Fig. 4: Reaktionstemperatur: 50°C; Reaktionszeit: 5h; Thermo-Spikes: keine; Splitting: 17 (672 - 689); Restgenomischer Anteil detektierbar (C); Keine vollständige Umwandlung  
25



## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in  
5 DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet, dass die folgenden Verfahrensschritte ausgeführt werden:  
  
eine genomische DNA Probe wird chemisch, bevorzugt  
mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit), der-  
10 art behandelt, dass Cytosin in Uracil umgewandelt  
wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,  
  
Abschnitte der Proben-DNA werden mit mindestens 2  
Primern in einer Polymerasereaktion, bevorzugt einer  
15 Polymerasekettenreaktion, amplifiziert,  
  
die Fragmente werden hinsichtlich der Basenzusammen-  
setzung jeweils der beiden komplementären Stränge des  
Amplifikates untersucht, wobei aus dem Unterschied im  
20 Molekulargewicht der beiden Stränge auf den Methylierungs-  
status in dem amplifizierten Abschnitt der genomischen DNA-Probe geschlossen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
25 dass der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge durch denaturierende Gelelektrophorese gemessen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
30 dass der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge durch Kapillargelelektrophorese bestimmt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
35 dass der Unterschied im Molekulargewicht der beiden

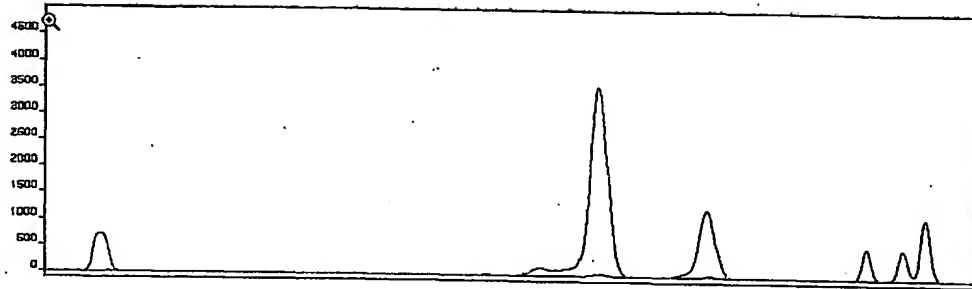
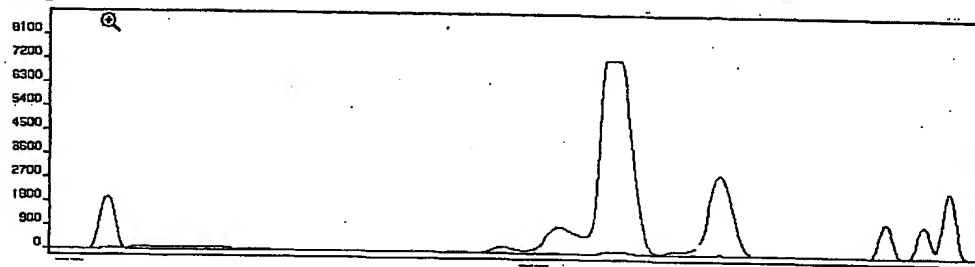
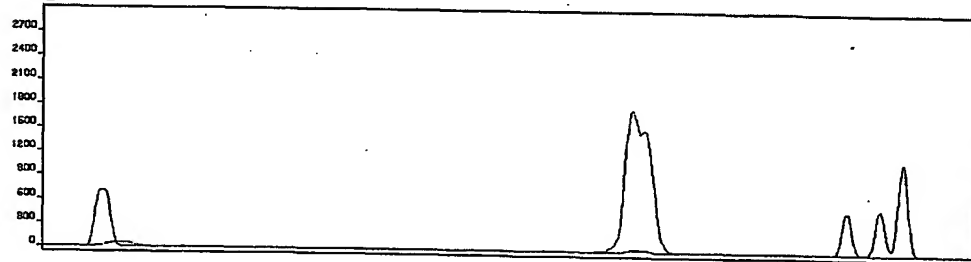
Stränge durch chromatographische Verfahren gemessen wird.

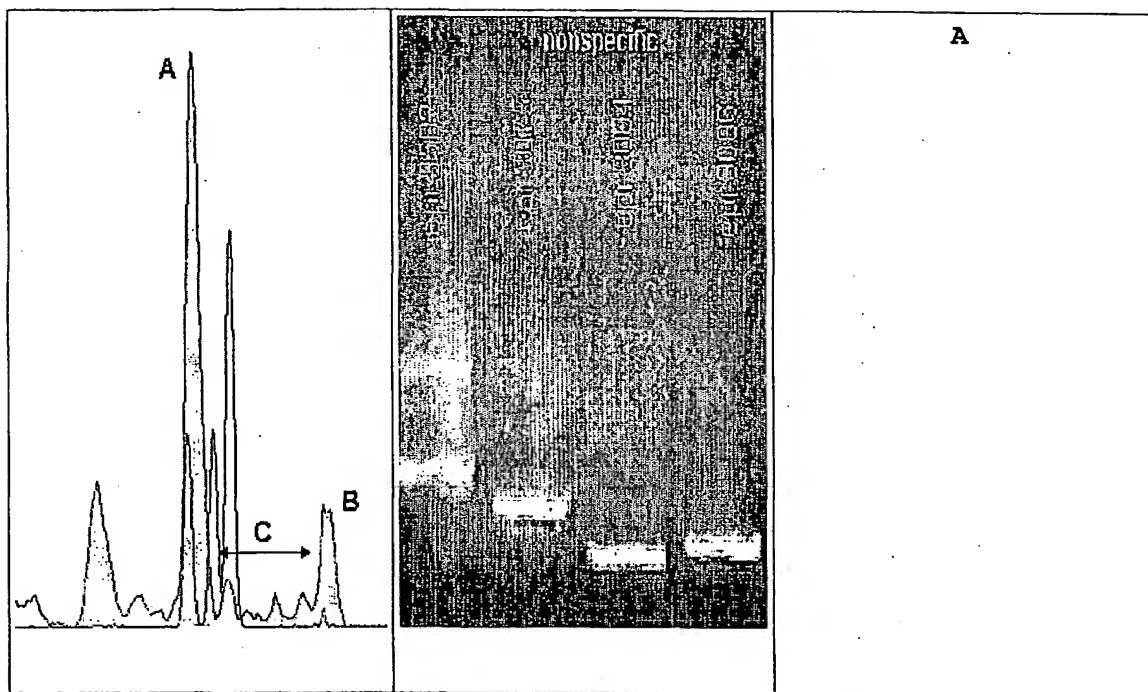
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
5 dass denaturierende Hochdruckflüssigkeits-chromatographie (HPLC) verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zum Moleku-  
10 largewicht auch noch weitere Faktoren wie z. B. der unterschiedliche Gesamtgehalt an Guanin, an Amino-funktionen oder Ketofunktionen der beiden komplementären Stränge zu ihrem unterschiedlichen Verhalten in einer der analytischen Methoden der Ansprüche 2 bis 5  
15 beitragen.
7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Unterschied im Molekulargewicht der beiden Stränge durch Massenspektrometrie gemessen wird.  
20
8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass Referenz-DNA bekannter  
Zusammensetzung und gleicher oder ähnlicher Länge bei  
25 der Analyse als externer oder interner Standard verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet,  
30 dass es sich bei der Referenz-DNA um Bisulfit-behandelte DNA aus einer Referenzprobe mit bekanntem Methylierungsstatus handelt oder aber um die ohne vorherige chemische Behandlung amplifizierte genomische DNA mit gleicher oder ähnlicher Fragmentlänge wie das jeweils analysierte Fragment.

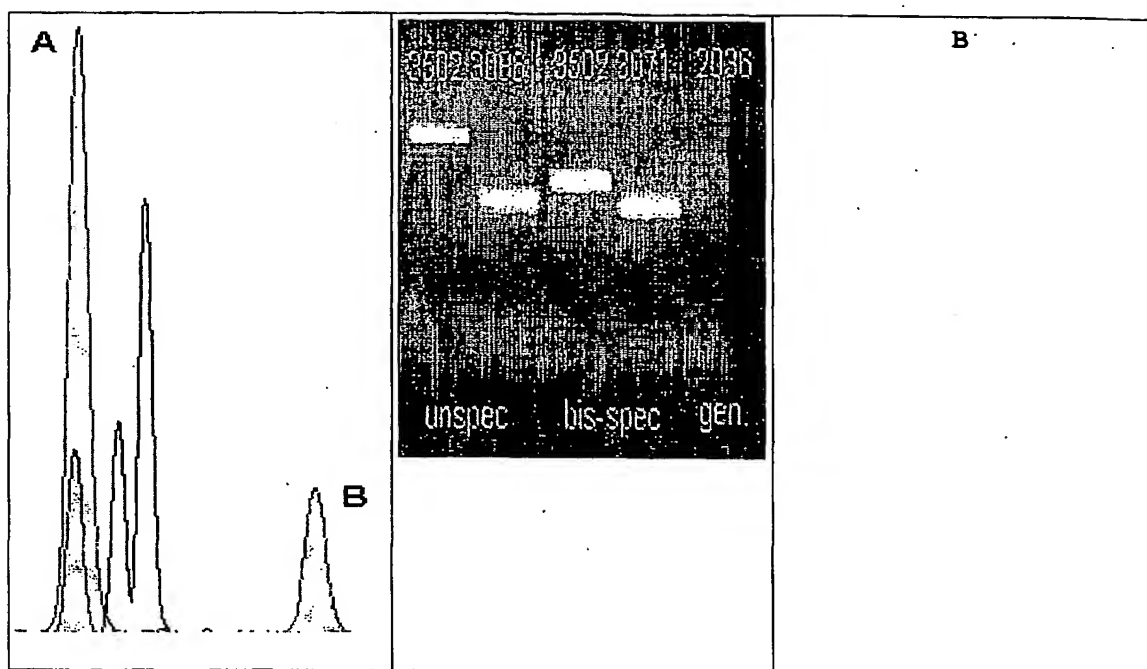
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proben DNA aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten eines Individuums, aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Serum, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern und allen möglichen Kombinationen hiervon gewinnt.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mehrerer Fragmente in einem Reaktionsgefäß in Form einer Multiplex-PCR durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in der Amplifikation eingesetzten Primer die chemisch mit Bisulfit umgewandelte DNA amplifizieren, nicht aber die entsprechende nicht umgewandelte genomische Sequenz.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass zugleich die Qualität der Bisulfitreaktion gemessen wird, indem auch nicht umgewandelte Fraktionen nachgewiesen werden.
- 5
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Primer gleichermassen Bisulfitumgewandelte sowie genomische DNA amplifizieren.
- 10
18. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate für die Detektion mit mindestens einer nachweisbaren Markierung versehen sind, die bevorzugt durch Markierung der Primer während der Amplifikation eingebracht wird.
- 15
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 20
20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Stränge der Amplifikate getrennt werden und insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und somit durch ihre jeweilige Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 25
22. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man aus dem Methylierungsgrad an den verschiedenen untersuchten CpG Positionen auf das Vorliegen einer Erkrankung oder eines anderen medizinischen Zustandes des Patienten schließt.
- 30

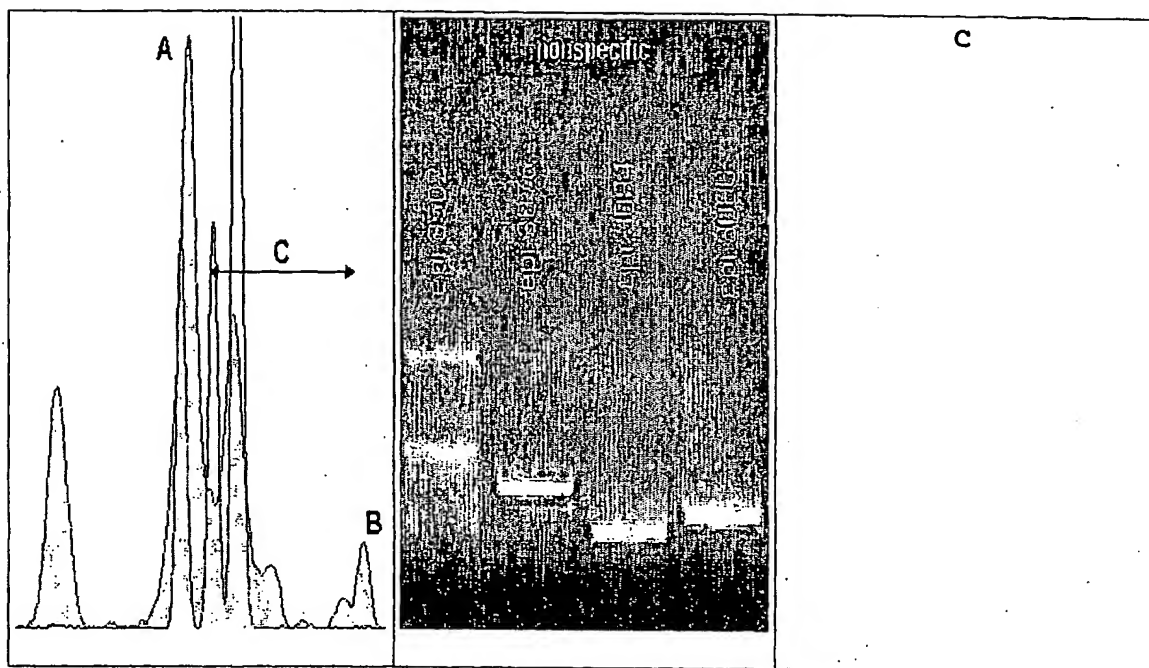
23. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens  
5 einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen;  
10 psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder  
15 Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des  
20 Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
25. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie  
30 optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-22.

**Fig. 1a****Fig. 1b****Fig. 1c**

**Fig. 2**

**Fig. 3**





**Fig. 4**

## SEQUENCE LISTING

5 <110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung durch vergleichende Analyse der Einzelstränge von Amplifikaten

10 <130> E01/1311/WO

<160> 10

15 <170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

25 <400> 1  
caagcatgct gaagaaagac cactgcag 28

30 <210> 2  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

35 <400> 2  
tggaactgt cccatagtag ctcccagc 28

<210> 3  
<211> 633  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<400> 3  
caagcatgct gaagaaagac cactgcagaa aaattttctcc tagccttttc aaagggtgta 60  
10 ggaagcagaa aggtgataca gaattggaga ggtcggagtt tttgtattaa ctgtattaaa 120  
tgcgaaatccc gagaaaattt cccttaacta cgtcctgtag ttatatggat atgaagactt 180  
atgtgaactt tgaaagacgt gtctacataa gttgaaatgt ccccaatgat tcagctgatg 240  
cgcgtttctc tacttgccct ttctagagag gtgcaacgga agccagaaca ttcctcctgg 300  
aaattcaacc tgtttcgcag tttctcgagg aatcagcatt cagtcaatcc gggccgggag 360  
15 cagtcacatg tggtgaggct gattggctgg gcaggaacag cgccggggcg tgggctgagc 420  
acagccgctt cgctctcttt gccacaggaa gcctgagctc attcgagtag cggctcttcc 480  
aagctcaaag aagcagaggc cgctgttcgt ttcctttagg tctttccact aaagtcggag 540  
tatcttcttc caaaatttca cgtcttggtg gccgttccaa ggagcgcgag gtaggggcac 600  
gcaaagctgg gagctactat gggacagttc cca 633  
20

<210> 4  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial  
25

<400> 4  
taagtatggt gaagaaagat tattgtag 28

<210> 5  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial  
30

<400> 5  
35

taaaaactat ccataataa ctccaac

28

<210> 6

<211> 633

5

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

10 taagtatgtt gaagaaagat tattgtagaa aaatTTTTTT tagTTTTTTT aaaggtgtta 60  
ggaagtagaa aggtgatata gaattggaga ggtcggagtt tttgtattaa ttgtattaaa 120  
tgcaatttc gagaaaattt tttttaatta cgtttttagt ttatatggat atgaagattt 180  
atgtgaattt tgaagacgt gtttatataa gttgaaatgt ttttaatgat ttagttgatg 240  
cgcgTTTTTT tatttgTTTT ttttagagag gtgtaacgga agttagaata ttttttttgg 300  
15 aaatttaatt tgtttcgtag ttttcgagg aattagtatt tagttaattc gggtcgggag 360  
tagttatttg tggtgagggt gattggttgg gtaggaatag cgtcggggcg tgggttgagt 420  
atagtcgttt cgTTTTTTTT gttataggaa gtttgagttt attcgagtag cggtTTTTTT 480  
aagtttaaag aagtagaggt cggtgttcgt tttttttagg tttttttatt aaagtcggag 540  
tatttttttt taaaatttta cgttttggtg gtcgttttaa ggagcgcgag gtaggggtac 600  
20 gtaaagtgg gagttattat gggatagttt tta 633

<210> 7

<211> 686

<212> DNA

25

<213> Artificial

<400> 7

aagggaataa agagaaaaga agtaccaggt gtcgtggtgt ctttgcgctc tgtcttttagg 60  
30 accggggaga gaagggttga cgctgtggtc gtggccctgg ccgggggggc gcgggggggg 120  
cggggttcgg gcggtgcgga gcagggcgcc gcgtgggtgg aaccacctgg gcgggttggtg 180  
ggggatacac ttagtgtccg agctgctgga ggagacttgg cctccgcagc tgcctcccg 240  
ccccccacgg ctgcccgggt cgggggtgca agtgaagcag cctccccgcg gaggccgcag 300  
cgccccgacc aggcctcttt aagcgcaggc cccgccccgg gcgccaccgc cccgccccgc 360  
35 ggatcccgct ccgcaccgc catcatgac tgcctggtgc tgaccatctt cgtaaacctc 420  
ttccccgcgg gtgagccgcg cggcgcgggc cgggggcggg tggccggtgc tgggccgggc 480

5           tgacggcccg tccccgcctg ccccgagcc tgcaccggcg cacacgaacg caccttcctg       540  
            gccgtgaagc cggacggcgt gcagcggcgg ctggtgggcg agattgtgcg gcgcttcgag       600  
            aggaagggt tcaagttggt ggcgctgaag ctggtgcagg tgggggcgcg gtgagcgagc       660  
            gggggcgcgg tgtgggggga agggga                                       686

10           <210> 8  
            <211> 24  
            <212> DNA  
            <213> Artificial

15           <400> 8  
            aagggaataa agagaaaaga agta                                       24

20           <210> 9  
            <211> 16  
            <212> DNA  
            <213> Artificial

25           <400> 9  
            tccccctccc cccaca                                       16

30           <210> 10  
            <211> 686  
            <212> DNA  
            <213> Artificial

35           <400> 10  
            aagggaataa agagaaaaga agtatttagg gtcgtggtgt ttttgcgttt tgtttttagg       60  
            atcggggaga gaagggttga cgttgtggtc gtggttttgg tcgggggggc gcggggggg       120  
            cggggttcgg gcggtgcgga gtagggcgtc gcgtgggtgg aattatttgg gcgggttg       180  
            gggatatag ttagtgttcg agttgttga ggagatttgg ttttcgtagt tgttttccg       240  
            ttttttacgg ttgtcgggtt tcggggtgta agtgaagtag ttttttcgcg gaggtcgtag       300  
            cgtttcgatt aggttttttt aagcgtaggt ttcgtttcgg gcgttatcgt ttcgtttcgc       360

ggatttcggtt ttcgtatcgt tattatgatt tgtttggtgt tgattatattt cgtaaatttt 420  
tttttcgcgg gtgagtcgcg cggcgcgggt cgggggcggg tggtcggtgt tgggtcgggt 480  
tgacgggttcg ttttcgtttg tttcgtagtt tgtatcggcg tatacgaacg ttttttttg 540  
gtcgtgaagt cggacggcgt gtagcggcgg ttggtgggcg agattgtgcg gcgtttcgag 600  
5 aggaagggtt ttaagttggt ggcgttgaag ttggtgtagg tgggggcgcg gtgagcgagc 660  
gggggcgcgg tgtgggggga agggga 686

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**